

Automatic combined target gene detecting method and detection instrument using said method

Patent number: CN1261667
Publication date: 2000-08-02
Inventor: FU WEILING (CN); WANG JIANGHUA (CN); LIU MINGHUA (CN)
Applicant: XI NAN HOSPITAL CHONGQING (CN)
Classification:
- international: G01N33/50
- european:
Application number: CN19990123578 19991110
Priority number(s): CN19980229873U 19981110; CN19990123578 19991110

Abstract of CN1261667

The present invention detects DNA by combining quartz crystal microbalance (QCM) technology and gene chip technology. Specifically, by means of minute machining technology, very thin quartz resonatorarray is first made through etching directly in piezoelectric quartz crystal and large amount of probes are then formed. Thus, large amount of DNA molecules or RNA molecules may be tested simultaneously, and this is superior to traditional nucleic acid imprint hybridization technology. The automatic target gene detecting method and detection instrument of the present invention has the advantages of in-situ detection, no need of marking, real-time detection, etc.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

G01N 33/50

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99123578.9

[43]公开日 2000年8月2日

[11]公开号 CN 1261667A

[22]申请日 1999.11.10 [21]申请号 99123578.9

[30]优先权

[32]1998.11.10CN [33]CN [31]98229873.0

[71]申请人 重庆西南医院

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号西南医院检验科

[72]发明人 府伟灵 汪江华 刘明华 王颖莹

[74]专利代理机构 北京元中专利事务所

代理人 王明霞

权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 组合靶基因自动检测方法及采用该方法的检测仪

[57]摘要

本发明涉及的是一种组合靶基因自动检测方法,以及基于该方法而构造的检测仪;本发明主要应用于石英晶体微天平 QCM 技术并结合基因芯片技术来检测 DNA;具体的方法是利用微细加工技术直接在压电石英晶体上刻蚀出超薄石英谐振器阵列,然后固化大量的探针,所以一次可以对大量的 DNA 分子或 RNA 分子进行检测分析,从而解决了传统核酸印迹杂交技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少等不足;本发明所述的靶基因自动检测方法极其检测仪具备可原位测定、无需标记、随时可获得检测信息、体积较小、便于携带、使用方便、成本低廉等优点。

ISSN 1008-4274

说明书

组合靶基因自动检测方法及采用该方法的检测仪

本发明涉及的是一种组合靶基因自动检测方法及采用该方法的检测仪。

随着人类基因组计划的逐步实施以及分子生物学相关学科的迅猛发展，基因序列数据库正以前所未有的速度迅速增长。

然而，如何研究众多基因的生物信息及其在生命过程中所担负的功能成了本领域研究人员需要解决的课题，这就对大量的脱氧核糖核酸 DNA、核糖核酸 RNA 序列测定及其分析提出了准确快速的要求。

基因芯片又称 DNA 芯片或生物芯片的出现为解决此类课题提供了可能的解决办法。所谓基因芯片 (Gene chip)，是指将大量探针分子固定于支持物上，然后与样品进行杂交，通过检测杂交信号的强弱而判断样品中靶分子的存在极其数量。由于用该技术可以将极其大量的探针同时固定于支持物上，所以一次可以对大量的 DNA 分子或 RNA 分子进行检测分析，从而解决了传统核酸印迹杂交技术复杂、自动化程度低、检测目的分子数量少等不足。

但是，如何使石英晶体传感器与芯片直接结合以达到实时检测和动态检测在现有技术中并未披露。

本发明的主要目的在于提供一种利用体外基因芯片技术对人类遗传病、肿瘤和传染性疾病进行基因诊断、基因分型以及法医学和环境分析的靶基因自动检测方法。

本发明的另一个目的是提供一种可供科研、临床使用的并基于上述方法而制造的检测仪。

本发明所述的检测方法是利用微细加工技术直接在石英晶体上刻蚀出超薄石英谐振器阵列，将大量探针分子对应地固定于镀有金或银膜层的石英谐振器阵列支持物上，晶体两侧通过银电极施加一定的电压，然后在探针与样品进行杂交，由于杂交与否会导致石英晶体谐振频率的改变，通过检测石英晶体谐振频率的变化值即可判断样品有无靶分子以及数量多少；在此基础上研制的高灵敏、可原位杂交监测的微型石英谐振基因传感器芯片，建立了检测灵敏度与目前标记 DNA 探针技术相当的非标记基因传感器检测技术，同时解决了现有基因检测技术只能检测少量基因信息的问题。

下面是本发明的附图说明，通过下面的说明并结合以下的详细描述，可以更清楚地理解本发明的原理和构造，其中：

附图 1 是本发明所述的组合靶基因自动检测仪中采用的 DNA 芯片示意图；

附图 2 是附图 1 所述的芯片的 A-A 向剖视图；

附图 3 是本发明所述的组合靶基因自动检测方法中电极表面探针固定情况示意图；

附图 4 本发明所述的组合靶基因检测仪对 HPV 及 LT 检测结果示意图，其中，Y 轴是频率减少值，X 轴是时间；

附图 5 是本发明所述的组合靶基因自动检测方法的流程示意图；

附图 6 是本发明所述的组合靶基因自动检测仪的电路和各部件连接方式示意图。

下面是本发明上述附图的各部件的标号，其中，1 探针层，2 是上金（或银）膜层，3 是石英晶体，4 是下金（或银）膜层，5 基座，6 是银电极，7 是探针（或者称已知基因片断），8 是支撑物。

下面是对本发明所述检测方法和检测仪进行详细描述。

本发明所述方法的特点是将基因芯片技术与压电传感器技术结合应用，构成独特的检测方法。

本发明是利用微细加工技术，直接在石英晶体上刻蚀出超薄石英谐振器阵列，石英晶体谐振频率对晶体表面质量微细改变十分敏感，因而其质量检出限可达 pg 级。并且由于微细加工技术使石英谐振器阵列易于成批制备，可大大降低成本。

本发明所述方法或检测仪所采用的基本技术原理如下：

1、压电现象及压电原理

晶体受外界机械压力的作用，在其表面上产生电荷的现象，称为压电效应。

早在 1880 年，研究人员就发现石英等一些晶体的压电现象并指出，某些电介质物质，在沿一定方向受到外力的作用变形时，内部会产生极化现象，同时在其表面上产生电荷；当外力去掉以后，又重新回到不带电的状态；而且，晶体表面所形成的电荷和外加压力成正比，现有技术将这种机械能转变为电能的现象，称为“顺压电效应”。

相反，在电介质极化的方向上施加电场，它会产生机械变形；当去掉外加电场时，电介质的变形随之消失，这种将电能转变成机械能的现象，被称为“逆压电效应”；现有技术中将具有压电效应的电介质物质统称为压电材料。

比较常见的压电材料有石英、陶瓷等，其中石英因其良好的机械、电化学和温度等综合性能，成为压电传感，特别是压电化学和压电生物传感的主要元件。

石英是一种各向异性晶体，按不同方向切割晶体，其物理性质（如弹性、压电效应、温度特性等）相差很大。

本发明的研究人员发现，当交变激励电压施加于压电晶体两侧的电极时，晶体会产生机械变形振荡，当交变电压频率达到晶体固有频率时，振幅加大，形成压电谐振，此特定频率称为谐振频率。

依据压电传感的敏感机理，用压电晶体为谐振结构，可以发现其输出信号

当其中一条链的序列已知时，通过检测杂交过程，就可以探明未知 DNA 样品中是否含有与已知序列互补的 DNA 存在。

虽然长链 DNA 分子不是刚性的，而且每个核苷酸残基都有 6 个可以自由旋转的单链，使 DNA 双螺旋可能以不同的构象形式存在；但是干燥状况下的短链 DNA 分子仍然具有一定的刚性，而且固定在电极上的寡核苷酸的空间距离很小；由于固定后的 DNA 在晶片上是成膜的，加上固定的寡核苷酸探针的质量相对晶体自身质量而言非常小，因此能够满足本发明的要求。

本发明所述的将压电基因传感器用于靶基因检测的基本工作原理是：在某个固体支持物上固定一段基因，具体地讲，所述的固定支持物可以是压电石英晶体，在压电石英晶体的二端通过银电极施加电压，从而得到一固定的频率，然后利用其在溶液中同与之互补的寡核苷酸进行杂交，杂交过程的质量负载和粘性耦合的变化通过导致石英压电晶体的频率变化，将该频率的变化值通过分析就可以得出是否杂交以及杂交的数量，从而实现了液相中具体的 DNA 的检测。已知基因片断在支持物上的固定情况如图 3 所示。

4、现有技术的发展概况

近年来，国内外有关基因传感器(也称为 DNA 和核酸生物传感器)的研究正成为生物传感器技术的研究热点，基因传感器以其简易、快捷、价廉的独特优越性，在分子生物学、医学检验和环境监测等领域具有广泛的应用前景，除基因序列分析、基因突变、基因检测和诊断外，还涉及 DNA 与药物、蛋白质分子间相互作用的研究等。

互补 DNA 的可逆杂交是复制、转录、翻译等生物过程的基础，核酸杂交对在分子水平上理解这些重要的生物过程是必不可少的。

当前，基因分析方法主要是在非均相体系中检测具体 DNA 的序列，比较常用的方法是核酸杂交法，核酸杂交是两条互补单链 DNA 以非共价键方式形成双键复合体的过程，当其中一条链的序列已知时，这是一种非常有用的分析技术，通过检测杂交过程，可以探明未知 DNA 样品中是否含有与已知序列互补的 DNA 存在，最常用的方法是在某个固体支持物上固定一段已知序列的基因，然后利用其在溶液中同与之互补的寡核苷酸进行杂交，从而实现液相中具体 DNA 的检测。

近年来，人们对通过杂交方法来检测液相中具体 DNA 序列的研究越来越深入，通过杂交法检测 DNA 序列有很重要的应用价值，主要应用在：临床基因诊断、法医学、食品、生物化学、环境保护等领域，而且基因的检测方法也因生物素、地高辛、荧光染料等非放射性标记物的应用而变得更加方便和安全，特别是多聚酶链反应 PCR 技术的应用，使得基因检测更加灵敏。

传统的 DNA 杂交反应都要求使用标记方法来检测杂交信号，这些方法允许原位检测，而且可以灵敏度很高。如：PCR 技术的检测限能达到 nmol/l ；DNA 计算机技术也提供了从大量混合体系中检测某一具体 DNA 序列的方法；由于短波荧光和

晶体，在压电石英晶体的二端通过银电极施加电压，从而得到一固定的频率，然后利用其在溶液中同与之互补的寡核苷酸进行杂交，杂交过程的质量负载和粘性耦合的变化通过导致石英压电晶体的频率变化，将该频率的变化值通过分析就可以得出是否杂交以及杂交的数量，从而实现了液相中具体的 DNA 的检测。已知基因片断在支持物上的固定情况如图 3 所示。

下面是本发明的所述的微型压电石英谐振器阵列基因传感器芯片归纳：

其中，本发明所述的微型压电石英谐振器阵列基因传感器芯片包括被刻蚀成阵列的 AT 切石英晶体 3，在石英晶体的下表面镀有金属膜层 4，在石英晶体阵的上表面镀有呈相同阵列的金属膜层 2，在呈阵列的上金属膜层 2 的上表面固化有探针阵列层 1，相应的探针 7 处固定有电极 6，下金属膜层与基座 5 热压键合；所述的阵列数至少为一个，优选至少为六个，最好至少为九个；其中，所述阵列的块数和被固化的探针层 1 的数量是相同的；所述阵列所呈现的块之间设有沟槽 9；所述的金属膜层可以是金膜层或银膜层；所述的电极是银电极；所述的基座是玻璃基座；为了减小其它因素的影响，在所述阵列中固化有同样探针中的一个被作为参比检测；本发明采用的固化方法可以是吸附法、共价键合法和组合法，但优选采用巯基末端修饰共价键结合法。

本发明所述的检测方法步骤分列如下：

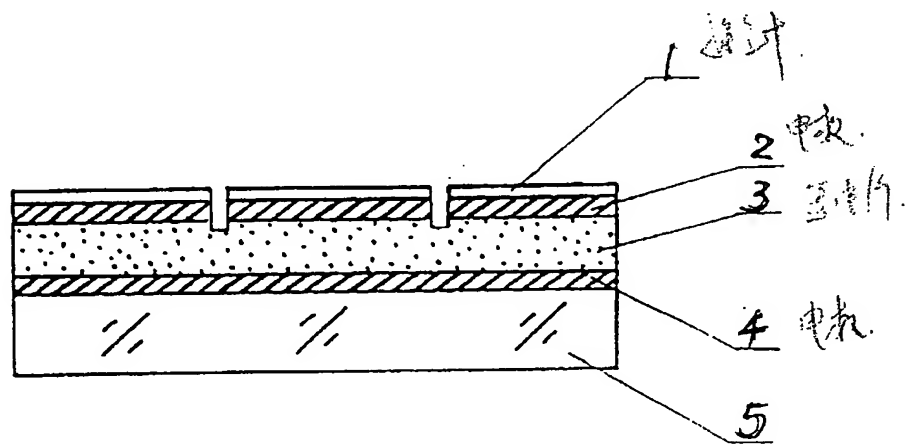
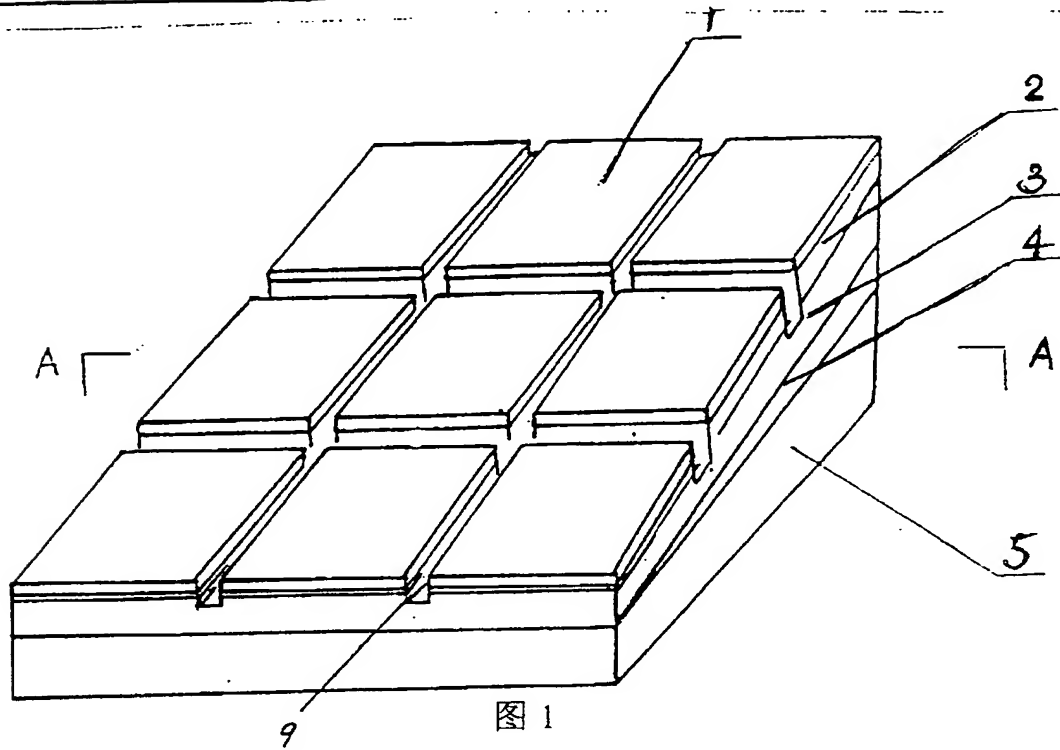
1. 标本处理 标本中核酸的提取，内切酶处理（不同标本用不同的酶）根据不同的样本进行目的片段的分离提纯等；
2. 若芯片非一次性使用，在进样测试前进行电极清洗，本发明所述的检测仪优选使用一次性芯片；
3. 启动电脑操作软件程序，内容包括进样、实时监控、信号处理、图像显示系统及结果分析；
4. 由经进样孔进样将标本合探针接触使之产生杂交反应；
5. 根据电脑数据及图像得到测试结果；
6. 清洗进样池及反应池；
7. 循环操作。

本发明所述的多道（孔）反应装置已经由申请人生产并公开出售。

本发明所述的靶基因组自动方法采用了生物工程学、分子生物学、传感器、微细加工技术等，其主要用途包括对疾病的诊断（传染性疾病、遗传病、肿瘤、心血管疾病等）、基因突变的检测、新药物的研制开发和环境监测。

采用本发明所述方法构造的靶基因自动检测仪的检测性能如下表 1 所示：

说明书附图



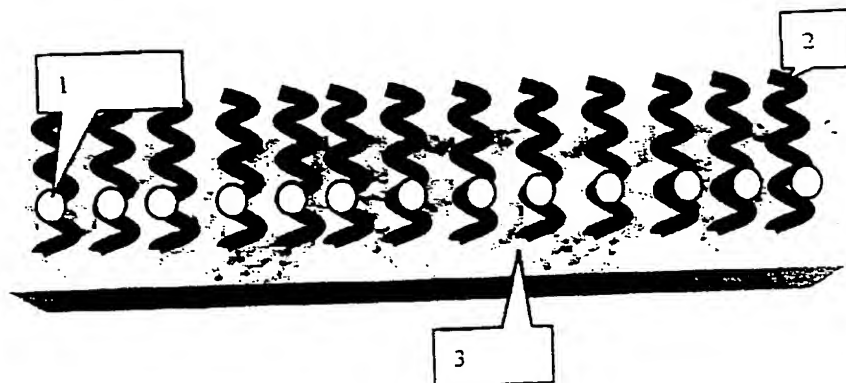


图 3

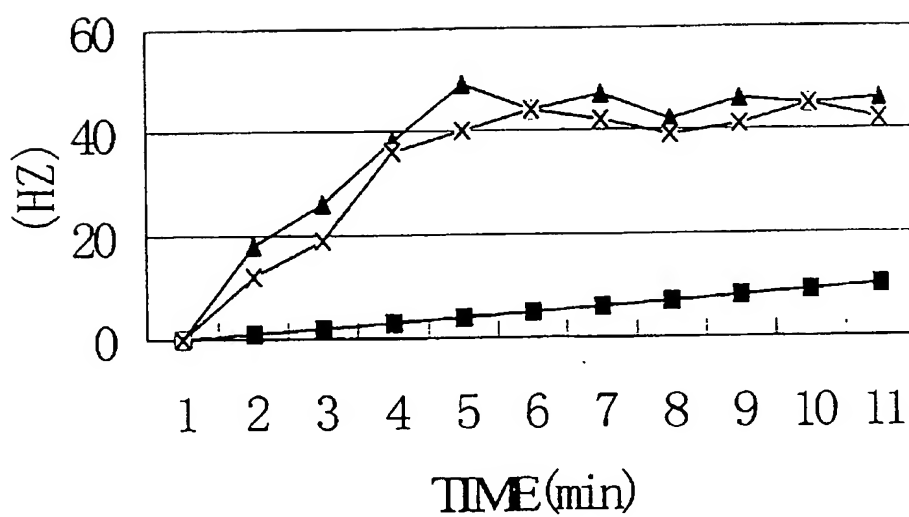


图 4